

论著

快速酯交换法测定不饱和脂肪酸含量的改进

方从容 杨杰 赵凯 崔明 杨大进

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘要:目的 解决目前国家标准中采用的快速酯交换法测定甘油酯型鱼油产品中不饱和脂肪酸含量偏低的问题。方法 改进的方法是将试样用正己烷溶解后,以氢氧化钾-甲醇酯交换反应进行甲酯化,酯交换溶液用水洗至中性,气相色谱进行检测。结果 4种主要不饱和脂肪酸的结果都在其标示值范围内。结论 改进后的方法适用于鱼油产品中甘油酯型不饱和脂肪酸的测定。

关键词: 不饱和脂肪酸;酯交换;气相色谱法

中图分类号:Q547;O657.7 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)03-0220-04

Improvement on Rapid Transesterification Method for Determination of Unsaturated Fatty Acids in Foods

FANG Cong-rong, YANG Jie, ZHAO Kai, CUI Ming, YANG Da-jin

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To solve the problem on the lower content of triglyceride ester type unsaturated fatty acids in fish oil products detected by the rapid transesterification method in the current national standard. **Method** The method was improved; after dissolving samples into *n*-hexane, the fatty acid was then methylated with potassium hydroxide-methanol transesterification; the transesterified solution was washing to neutral with water and then detected by gas chromatography. **Results** The results of four main unsaturated fatty acids (α -linolenic acid, EPA, DPA and DHA) were in the satisfactory range. **Conclusion** The improved method was simple, accurate and reliable for the determination of triglyceride ester type unsaturated fatty acids in fish oil products.

Key words: Unsaturated Fatty Acids; Transesterification; Gas Chromatography

脂肪酸甲酯化是气相色谱法测定脂肪酸必不可少的步骤之一,其方法较多,如三氟化硼催化法^[1,2]、快速酯交换法^[1,3]、重氮甲烷法^[4]及硫酸盐催化法^[2]。在这些方法中,重氮甲烷法中的重氮甲烷试剂不易获得;酸催化法需要加热回流,且甲酯化时间较长,一般需40~60 min;三氟化硼催化法是测定脂肪酸的经典方法,样品需先皂化再酯化,过程复杂且三氟化硼有毒,对人体毒害较大;而国家标准^[1]中快速酯交换法操作简便、快速、易于掌握,适用于游离脂肪酸 $\leq 2\%$ 的食用油脂,但在实际应用中发现,不饱和脂肪酸的测定值偏低,常与产品标示值不符。因此,本研究在原国家标准方法的基础上,用FAPAS T1465质控样作为同类基质的产品,通过正交试验考察了溶解溶剂、酯交换试剂、酯交换试剂浓度及酯交换反应温度对酯交换的影响,

确定了测定 α -亚麻酸、EPA、DPA和DHA 4种不饱和脂肪酸含量的最佳实验条件。改进后的酯交换法,提高了酯交换率,用正己烷代替了异辛烷,酯交换试剂氢氧化钾-甲醇溶液的浓度由2.0 mol/L改为0.5 mol/L,将原标准中用硫酸氢钠中和过量的氢氧化钾改为用水洗至中性,在20 min内就可完成样品的酯交换过程,鱼油产品和FAPAS T1465质控样中的不饱和脂肪酸的测定结果都在其标示值范围内(FAPAS T1465 α -亚麻酸9.4~11.4 mg/g, EPA 113.3~138.4 mg/g, DPA 16.9~20.7 mg/g, DHA 97.8~119.6 mg/g),方法简单、准确可靠,且改进后的快速酯交换法能满足鱼油产品中脂肪酸质量分析的要求。

1 材料与方法

1.1 仪器

气相色谱仪(Agilent 6980N)带有氢离子火焰检测器;数控水浴锅;MS₂涡旋混匀器。

1.2 试剂

甲醇(HPLC级, J. T. Bake); 正己烷(HPLC级,

收稿日期:2009-12-20

基金项目:脂肪酸标准的修订(20080013-T-361)

作者简介:方从容 女 副主任技师 研究方向为食品检验分析

Email:fangcongrong@yahoo.com.cn

通信作者:杨大进 男 研究员

J. T. Bake); 氢氧化钾(分析纯,北京化学试剂厂); 苯(分析纯,北京化学试剂厂); 氢氧化钠(分析纯,北京化学试剂厂); α -亚麻酸甲酯(Fluka 公司生产,纯度 $\geq 99\%$); EPA 甲酯(sigma 公司生产,纯度 $\geq 98\%$); DPA 甲酯(sigma 公司生产,纯度 $\geq 99\%$), DHA 甲酯(sigma 公司生产,纯度 $\geq 98\%$)。

1.3 色谱条件

INNOWAX 毛细管柱: 30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μ m, 载气 N_2 , 采用程序升温, 初始温度 180 $^{\circ}C$, 以 15 $^{\circ}C/min$ 的速率升到 230 $^{\circ}C$, 保持 4 min, 再以 8 $^{\circ}C/min$ 的速率升到 240 $^{\circ}C$, 保持 13 min; H_2 : 40 ml/min, 空气: 450 ml/min; 进样口温度 240 $^{\circ}C$, 检测器温度 270 $^{\circ}C$ 。

1.4 脂肪酸标准液的配制

称取一定量的 α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯、DHA 甲酯于 10.0 ml 容量瓶中, 分别用正己烷溶解并稀释至刻度, 摇匀备用。 α -亚麻酸、DPA、DHA、EPA 甲酯标准储备液的浓度为 3.00 mg/ml。

1.5 方法

称取 0.500 g 样品于 50.0 ml 的容量瓶中, 用正己烷溶解并稀释至刻度, 混匀。准确量取 2.0 ml 溶液于 10 ml 试管中, 加入 2.0 ml 氢氧化钾-甲醇溶液(0.5 mol/L), 于涡旋混匀器上混匀 5 min, 加水至 10 ml 刻度。静置分层, 用吸管吸出下层溶液, 再加水至 10 ml 刻度, 此步骤重复 2 次, 直至下层溶液为中性, 取上清液注入气相色谱仪, 测定不饱和脂肪酸的含量。

2 结果

2.1 对国标法改进的初步研究

在不改变样品溶解溶剂为异辛烷的情况下, 通过增加酯交换反应时间和氢氧化钾-甲醇溶液的量, 了解酯交换反应的情况, 结果见表 1 和表 2。

表 1 FAPAS T1465 质控样在不同的酯交换反应时间的测定结果(mg/g)

项目	酯交换反应时间		
	30 s	3 min	5 min
α -亚麻酸	8.9	9.2	9.0
EPA	107.8	106.5	108.0
DPA	15.2	15.1	15.0
DHA	93.5	92.4	94.0

表 2 增加氢氧化钾-甲醇溶液的量对 FAPAS T1465 质控样结果的影响(mg/g)

项目	氢氧化钾-甲醇溶液使用量	
	0.2 ml	1.0 ml
α -亚麻酸	8.9	9.1
EPA	107.8	109.1
DPA	15.2	15.6
DHA	93.5	93.0

从表 1 和表 2 中可知, 当溶解溶剂为异辛烷时, 增加酯交换反应时间和氢氧化钾-甲醇溶液的量, 4 种不饱和脂肪酸的含量差异不大, 且都明显低于标示值, 说明酯交换反应不完全, 应做进一步的研究。

2.2 试验因素与因素水平的确立

根据以上的初步研究、以往脂肪酸正交试验 $L_{27}(3^6)$ 的结果及文献报道^[1,3,5,6] 得知, 在脂肪酸甲酯的过程中, 影响酯交换效率的因素有 4 项: 溶解溶剂(A), 酯交换试剂(B), 酯交换试剂浓度(C), 酯交换温度(D)。本文通过正交试验 $L_8(2^4)$, 按照 1.5 甲酯交换方法, 寻求酯交换的最佳实验条件。方案见表 3, 结果及分析见表 4~表 7。

表 3 因素水平表

水平	因素			
	A 溶解溶剂	B 酯交换试剂	C 酯交换试剂浓度	D 酯交换温度
1	苯 + 正己烷 = 1 + 1	氢氧化钾-甲醇	0.5 mol/L	室温(20 ~ 30 $^{\circ}C$)
2	正己烷	氢氧化钠-甲醇	2.0 mol/L	50 $^{\circ}C$

表 4 α -亚麻酸 $L_8(2^4)$ 正交试验设计及测定结果

试验号	A 溶解溶剂	B 酯交换试剂	C 酯交换试剂浓度	D 酯交换温度	α -亚麻酸(mg/g)
1	2	1	2	2	8.64
2	1	2	2	1	7.10
3	2	1	2	1	15.55
4	2	2	1	1	17.46
5	1	2	2	2	7.85
6	1	1	1	1	14.63
7	2	2	1	2	9.50
8	1	1	1	2	9.35
第 1 水平	9.73	12.04	12.74	13.68	
第 2 水平	12.79	10.48	9.78	8.84	
极差 R	3.06	1.56	2.96	4.84	
主次顺序	酯交换温度 > 溶解溶剂 > 酯交换试剂浓度 > 酯交换试剂				
优组合	正己烷 + 氢氧化钾 - 甲醇 + 0.5 mol/L + 室温(20 ~ 30 $^{\circ}C$)				

表 5 EPA L₈(2⁴) 正交试验设计及测定结果

试验号	A 溶解溶剂	B 酯交换试剂	C 酯交换试剂浓度	D 酯交换温度	EPA (mg/g)
1	2	1	2	2	99.28
2	1	2	2	1	78.73
3	2	1	2	1	126.35
4	2	2	1	1	130.52
5	1	2	2	2	92.06
6	1	1	1	1	123.74
7	2	2	1	2	110.21
8	1	1	1	2	109.51
第 1 水平	101.01	114.72	118.50	114.84	
第 2 水平	116.59	102.88	99.11	102.77	
极差 R	15.58	11.84	19.39	12.07	
主次顺序	酯交换试剂浓度 > 溶解溶剂 > 酯交换温度 > 酯交换试剂				
优组合	正己烷 + 氢氧化钾 - 甲醇 + 0.5 mol/L + 室温 (20 ~ 30 ℃)				

表 6 DPA L₈(2⁴) 正交试验设计及测定结果

试验号	A 溶解溶剂	B 酯交换试剂	C 酯交换试剂浓度	D 酯交换温度	DPA (mg/g)
1	2	1	2	2	15.70
2	1	2	2	1	12.76
3	2	1	2	1	20.28
4	2	2	1	1	21.78
5	1	2	2	2	14.25
6	1	1	1	1	18.71
7	2	2	1	2	17.03
8	1	1	1	2	16.42
第 1 水平	15.53	17.77	18.48	18.38	
第 2 水平	18.70	16.46	15.75	15.85	
极差 R	3.27	1.31	2.73	2.53	
主次顺序	溶解溶剂 > 酯交换试剂浓度 > 酯交换温度 > 酯交换试剂				
优组合	正己烷 + 氢氧化钾 - 甲醇 + 0.5 mol/L + 室温 (20 ~ 30 ℃)				

表 7 DHA L₈(2⁴) 正交试验设计及测定结果

试验号	A 溶解溶剂	B 酯交换试剂	C 酯交换试剂浓度	D 酯交换温度	DHA (mg/g)
1	2	1	2	2	97.08
2	1	2	2	1	71.16
3	2	1	2	1	122.95
4	2	2	1	1	128.71
5	1	2	2	2	85.12
6	1	1	1	1	123.36
7	2	2	1	2	111.70
8	1	1	1	2	107.97
第 1 水平	96.90	112.84	117.94	111.54	
第 2 水平	115.11	99.17	94.08	100.47	
极差 R	18.21	13.67	23.84	11.07	
主次顺序	酯交换试剂浓度 > 溶解溶剂 > 酯交换试剂 > 酯交换温度				
优组合	正己烷 + 氢氧化钾 - 甲醇 + 0.5 mol/L + 室温 (20 ~ 30 ℃)				

从表 4 ~ 表 7 中可以看出,测定 α-亚麻酸、EPA、DPA、DHA 4 种脂肪酸的最佳优化组合为 A2B1C1D1,即溶解溶剂正己烷,酯交换试剂氢氧化钾-甲醇,酯交换浓度 0.5 mol/L,酯交换温度室温 (20 ~ 30 ℃)。另外,由表 4 ~ 7 中极差 R 值分析结果可知,虽然影响这 4 种脂肪酸酯交换的主要因素不尽相同,但由于最优组合是一致的,则认为主次顺序对实验影响不大。

2.3 对优选的酯交换法进行再优化

正交试验选择的 4 因素中没有考虑酯交换后放置时间对结果的影响,因此对优选出的 A2B1C1D1 法进行再优化,结果见表 8。

表 8 酯交换后放置时间对结果的影响 (n = 3, mg/g)

脂肪酸名称	酯交换后放置时间	
	0 min	10 min
α-亚麻酸	10.8	10.7
EPA	120.5	121.2
DPA	18.5	18.3
DHA	109.2	112.3

结果显示,酯交换后放置 10 min 和酯交换后立即加水洗涤对检测结果影响不明显,因此可去除酯交换后放置时间这一实验步骤。

2.4 用国标酯交换法和改进后酯交换法对 FAPAS T1465 质控样和某鱼油产品中的脂肪酸进行测定,结果见表 9 和表 10。

表 9 FAPAS T1465 质控样用两种酯交换法测定结果的比较($n=6, \text{mg/g}$)

脂肪酸名称	FAPAS T1465	
	改进方法	国标法
α -亚麻酸	10.8	8.9
EPA	119.8	107.8
DPA	18.1	15.2
DHA	106.2	93.5

从表 9 和表 10 中可明显看出,改进后的酯交换

表 11 优选酯交换方法实验结果

编号	α -亚麻酸(mg/g)	EPA(mg/g)	DPA(mg/g)	DHA(mg/g)
1	10.0	122.3	18.5	109.2
2	10.2	121.6	18.3	107.9
3	9.9	120.8	18.2	106.6
4	9.8	119.2	18.0	105.8
5	9.7	117.5	17.8	103.6
6	9.7	117.3	17.8	104.0
7	10.5	122.4	18.4	111.2
8	10.1	130.1	17.9	108.2
9	9.9	120.2	17.7	106.3
10	9.8	119.8	17.9	105.2
11	10.4	129.2	18.5	110.5
12	10.6	124.7	18.4	112.7
平均值(mg/g)	10.1	122.1	18.1	107.6
标准偏差(mg/g)	0.31	4.10	0.30	2.88
RSD(%)	3.1	3.4	1.6	2.7
标示值(mg/g)	9.4~11.4	113.3~138.4	16.9~20.7	97.8~119.6

结果表明,用正交试验优化出的酯交换方法分析 FAPAS 鱼油质控样,4 种不饱和脂肪酸的测定值都在其标示范围内,且 $RSD \leq 5\%$,说明用改进的酯交换方法测定不饱和脂肪酸,其精密度、方法的重现性和准确度都达到质量分析的要求。

3 讨论

本研究主要是对国标 GB/T 17373—2008《动植物油脂 脂肪酸甲酯制备》中的酯交换方法进行了改进,所选样品都为甘油酯类保健鱼油产品,如样品为固体类型,应先用酸水解法提取脂肪后,再按本方法进行甲酯化处理。另外,在市场上出现了少量乙酯型的保健鱼油产品,但这类产品不适用于用本方法进行检测,可用正己烷溶解样品后,用乙酯型脂肪酸标准直接进行定性定量分析。

法比国标酯交换法的测定值高 10% 左右,并且符合产品质量的要求,说明改进后的酯交换法可靠,准确。

表 10 某鱼油产品用两种酯交换法测定结果的比较($n=6, \text{mg/g}$)

脂肪酸名称	某鱼油产品		国标法
	产品标示值	改进方法	
α -亚麻酸	-	-	-
EPA	66.0	66.0	59.1
DPA	39.0	38.5	30.8
DHA	88.0	88.4	79.3

注: - 表示未检出。

2.5 方法的技术参数实验结果

在 2 天内,用 FAPAS T1465 对优选出的酯交换方法进行方法的精密度、重现性和准确度实验,结果见表 11。

参考文献

- [1] 国家粮食局. GB/T 17373—2008 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [2] 陈伟平,黄晓红,林敏红,等. 螺旋藻中亚油酸和 α -亚麻酸含量的气相色谱法同时测定[J]. 分析测试学报,2000,19(4): 57-59.
- [3] 韩深,卢晓宇,邵瑞婷. GC-FID 甲酯交换法测定橄榄油中六种脂肪酸[J]. 分析实验室,2007,26(12):137-139.
- [4] 孙素玲,顾小红,汤坚,等. 海狗油中脂肪酸的组成成分[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(2):107-110.
- [5] 皋志春,崔鹤,姜志刚. 毛细管气相色谱法测定海狗油保健品中有效成分 EPA、DPA 及 DHA[J]. 检验检疫科学,2003,13(2):16-18.
- [6] BONDIN E M, CASTELLOTE A I, LOOPEZ M C, et al. Determination of plasma fatty acid composition in neonates by chromatography[J]. Chromatogr B,1994,658:369-374.